

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-114681

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月6日

| (51) Int.Cl. <sup>8</sup> | 識別記号  | F I                 |
|---------------------------|-------|---------------------|
| A 6 1 K 45/00             | A C S | A 6 1 K 45/00 A C S |
| 9/06                      | A E D | 9/06 A E D G        |
| 31/165                    | A D A | 31/165 A D A        |
| 31/19                     | A B J | 31/19 A B J         |

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-239547  
(22) 出願日 平成9年(1997) 9月4日  
(31) 優先権主張番号 9 6 2 0 2 4 6 0 - 0  
(32) 優先日 1996年9月4日  
(33) 優先権主張国 ベルギー (B E)

(71) 出願人 596099561  
ブレイエ・ユニバーシテイト・ブリュッセル  
V R I J E U N I V E R S I T E I T  
B R U S S E L  
ベルギー王国、1050 ブリュッセル、ブレ  
インラーン、2  
(72) 発明者 アルベルト・エマヌエル・コルネイレ・ヘ  
ールツ  
ベルギー、ペー-1150ブリュッセル、エグ  
ランティールラーン23ブース7番  
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗線維症薬

(57) 【要約】

【課題】 線維症の処置のための薬剤組成物およびその使用方法の提供。

【解決手段】 有効量のヒストン・デアセチラーゼ阻害剤(特に、トリコスタチンAまたは製剤上容認できるその塩)および場合により適した付形剤を、線維症の被験体に投与する処置方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 線維症の処置用製剤組成物の調製のためのヒストン・デアセチラーゼ阻害剤の使用。

【請求項2】 ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤がトリコスタチンAまたは製剤上容認できるその塩である請求項1記載の使用。

【請求項3】 ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤が酪酸ナトリウムである請求項1記載の使用。

【請求項4】 活性成分の量が0.1~50重量%で変化する請求項1~3のいずれかに記載の使用。

【請求項5】 活性成分の成人に対する一日の投与量が0.05~100mgである請求項4記載の使用。

【請求項6】 製剤用の塩が、ナトリウム塩またはカリウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩またはマグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩あるいはトリエチルアミン塩またはエタノールアミン塩のような有機塩基を含む塩である請求項1~5記載のいずれかに記載の使用。

【請求項7】 抗線維症処置に必要なヒトまたは動物に、抗線維症薬として、請求項1~6のいずれかに記載の製剤組成物の治療上有効な量を投与することを含んで成る線維症の処置方法。

【請求項8】 製剤組成物を、非経口的、特にクリームもしくは軟膏、注入溶液、点滴または座薬の形態で投与する請求項7記載の線維症の処置方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、線維症（例えば肝線維症、肝硬変、並びに肥厚性瘢痕、ケロイドおよびデュビュイトラン拘縮のような線維性皮膚病）の処置のための薬剤組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】一般に、線維症は、皮膚、または肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓などのような臓器内での結合組織の過剰沈着を特徴とする症状である。肝線維症は、結合組織タンパク質の過剰沈着を特徴とする突発的な症状である。それは、単一の病気であるというよりも、ウイルス性肝炎、アルコール性肝疾患、住血吸虫症等を含む様々な疾患からもたらされる症状である。疾患の初期の原因によって、肝臓実質が結合組織で徐々に置換され、結果として、肝機能が変敗する。

【0003】皮膚線維症は、真皮内での結合組織タンパク質の過剰な沈着を特徴とする突発的な症状である。皮膚線維症は、機械的外傷、熱傷、慢性的炎症または慢性的自己免疫を含む、種々の皮膚創傷に起因する。初期の原因によって、皮膚の真皮が厚くなる。現在まで、線維症の処置において真に有効な治療薬は存在していない。

【0004】肝臓星細胞は、通常の肝臓と線維症の肝臓の両方に細胞を増殖する主要な結合組織である。通常の状態では、星細胞は、ビタミンA貯蔵部位として供給さ

れる。この細胞は、静止しており、ほとんど増殖活性を示さず、結合組織タンパク質の限られた範囲を表す。しかしながら、創傷をおったまたは線維症の肝臓において、星細胞は、その脂肪液滴を失って、その表現型細胞を筋繊維芽細胞のような細胞に変える。この筋繊維芽細胞のような細胞は、「活性化」細胞であって、高い増殖活性を示し、大量のコラーゲンおよび他の細胞外マトリックスタンパク質を増殖する。

【0005】従って、この種の細胞は、治療介入のための理論上の目標である。星細胞において抗線維症効果を有する化合物は、肝臓線維症や肝硬変の処置のために有望な候補分子であろう。

【0006】通常の皮膚の筋繊維芽細胞は静止している。それは、制御された量の結合組織タンパク質を合成し、低い増殖活性を有する。皮膚が創傷をおった後、この細胞は、活性化される（すなわち、それは、増殖して、平滑筋の $\alpha$ -アクチンを発現し、大量の結合組織タンパク質を合成する）。活性化された細胞は、しばしば、筋繊維芽細胞と呼ばれる。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記のような線維症を処置するための抗線維症薬並びにその使用を提供するものである。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、線維症の処置用製剤組成物の調製のためのヒストン・デアセチラーゼ阻害剤およびその使用を提供する。

【0009】本発明によれば、驚くべきことに、サブマイクロモル濃度のヒストン・デアセチラーゼ阻害剤〔特にトリコスタチン(trichostatin) A〕は、培養された肝臓の星細胞と皮膚筋繊維芽細胞の筋繊維芽細胞的分化の3つの主要な特徴：

(1) 肝臓または多くの他の臓器内の線維症における主要コラーゲンである、コラーゲンI型およびIII型の合成；

(2) 細胞増殖；および

(3) 分化した筋繊維芽細胞に対するマーカーである、平滑筋の $\alpha$ -アクチンの発現

を強く阻害することが見いだされた。この結果は、トリコスタチンAが、有効な抗線維症薬であって、先に述べた他の治療用化合物とは全く異なることを示している。

【0010】本発明は、線維症の処置のための薬剤化合物を調製するためのヒストン・デアセチラーゼ阻害剤または薬剤的に容認され得るその塩の使用を目指している。

【0011】現在、ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤としては6つの化合物が知られている。ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤は、ヒストン・デアセチラーゼの活性を阻害して、ヒストンのインハイパーアセチレーション(hyperacetylation)をもたらす物質であって、

- ・トラボキシン(trapoxin)
- ・トリコスタチン(trichostatin) A、B、C
- ・酪酸ナトリウム
- ・アピシジン(apicidin) A (環状テトラペプチド)
- ・HC-トキシシン(環状テトラペプチド)
- ・キラミドシン(chlamydocin)

を含んで成る。

【0012】酪酸ナトリウムは、非競争手段においてヒストン・デアセチラーゼを阻害する、天然の炭素数4の脂肪酸であって、その生体活性に対してミリモル濃度必要とする。トリコスタチンAとトラボキシンは、ヒストン・デアセチラーゼの具体的な阻害剤であり、酪酸ナトリウムよりも大変有効であって、サブマイクロモル範囲で有効である。

【0013】本明細書中の記載は、特に、非限定的な例としてのトリコスタチンAを目的としており、本発明の範囲を不当に限定するものではない。

【0014】

【発明の実施の形態】トリコスタチンAまたはその誘導体が、線維症の処置用抗線維症薬として有用であることを開示している。薬剤組成物およびトリコスタチンA化合物の使用についても開示している。

【0015】トリコスタチンAは、ツジ(Tsuji)らによってStreptomyces属の吸湿物質(hygroscopicus)から初めて単離された抗真菌剤である(J. Antibiot. 29: 1~6頁、1976年)。トリコスタチンAは、抗がん剤(Cancer Res. 47: 3688~3691頁、1987年)および抗原虫剤[antiprotozoal agent (J. Antibiot. 41: 461~468頁、1988年)]としても有用である。実験過程において、我々は、トリコスタチンAが、肝臓内で細胞を増殖する主要な結合組織である肝臓の星細胞に対して強い抗線維症効果を有することを発見した。

【0016】トリコスタチンAは、薬剤上容認できる塩の形態で採用される。そのような薬剤上容認できる塩は、前記化合物の所望の薬剤効果に悪影響を与えない程度長く使用され得る。当業者は、選択および生成を成し得る。薬剤上容認できる塩としては、例えば、ナトリウム塩またはカリウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩またはマグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩あるいはトリエチルアミン塩またはエタノールアミン塩のような有機塩基を含む塩基を使用し得る。

【0017】本発明によって処置される被験体は、ヒトと動物の両者を包含する。

【0018】本発明の抗線維症薬は、経口的または非経口的に投与され得る。経口的に投与する場合、それは、ソフトおよびハードカプセル、錠剤、顆粒、粉末、溶液、懸濁液等の形態で投与され得る。非経口的に投与する場合、それは、軟膏または注入溶液、点滴液組成物、あるいは固体、粘稠液体または懸濁液の形態で連続メ

ン吸収を維持することができる座薬の形態で投与され得る。当業者は、上記組成物の調製方法および媒介物(ジスインテグレーターまたは懸濁化剤)の選択を容易に成し得る。本発明の抗線維症薬は、トリコスタチンAまたは薬剤上容認できるその塩に加えて、抗線維症活性を有する別の物質も含有してよい。

【0019】本発明の組成物中、活性成分の量は、組成物に依存して変化してよいが、投与方法に関わりなく、通常、0.1~50重量%である。投与量は、年齢、性別および被験者の司つかんの症状、所望の治療効果、投与期間等を考慮して決定される。しかしながら、好ましくは、成人の場合、活性成分の1日の投与量は、0.05~100mgである。

【0020】

【実施例】以下に実施例を用いて本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

調製例

Streptomyces platensis No.145の培養液から、トリコスタチンA: 7-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-N-ヒドロキシ-4,6-ジメチル-7-オキソ-2,4-ヘプタジエンアミドを調製した。酪酸ナトリウムは、シグマ社(Sigma, (セントルイス(St. Louis)、ミズーリ州、米国))から入手した。トリコスタチンAの貯蔵溶液をエタノール中で調製し(2mg/mL)、-20℃で貯蔵して、各実験において必要に応じて希釈した。培地中のエタノールの最終濃度は、0.0016%であった。酪酸ナトリウムの貯蔵溶液(100ミリモル/L)を蒸留水中で調製して、必要に応じて希釈した。

【0021】実施例1

肝臓星細胞によるコラーゲンI型およびIII型並びに平滑筋α-アクチンの合成におけるトリコスタチンAおよび酪酸ナトリウムの効果

肝臓星細胞の培養物を用いてトリコスタチンAと酪酸ナトリウムの抗線維症活性を試験した。ウィスター(Wistar)ラット(400~500g)から、コラーゲナーゼ/プロナーゼ/DNA酵素による肝臓の酵素的消化によって星細胞を採った後、ニコデンツ[Nicodenz、ニコムド(Nycomed、オスロ、ノルウェー)製]で密度勾配遠心処理した。採取した後、細胞を、10%ウシ胎児血清、ペニシリン100U/mLおよびストレプトマイシン100μg/mLで補充したダルベッコ変法イーグル培地に懸濁し、5%CO<sub>2</sub>および95%空気を含む加湿した雰囲気において37℃で培養した。

【0022】日中、3つの細胞をトリコスタチンA(1~100nmol/L)に24時間曝露した。次の24時間では、細胞を、トランス<sup>35</sup>S-ラベル25μCi/mL(<sup>35</sup>S-メチオニンの比活性>1,000Ci/mmol、ICNバイオメディカルズ製、コスタ・メサ(Costa Mesa)、カリフォルニア州)で代謝的にラベルすると同時に、前記化合物への曝露を継続した。ラベル後、培地を回収し、コラーゲンI

型およびIII型並びに平滑筋 $\alpha$ -アクチンに対する抗体を用いて免疫沈殿 (immunoprecipitation) に付した。沈殿物をSDS-PAGEで分割し、特定バンドの放射能をフォスフォーイメージング (PhosphorImaging) 法で測定した。mRNAレベルでの効果のために、細胞をトリコスタチンA 100nmol/Lに24時間曝露した。その後、RNAを抽出し、ノーザン (Northern) 雑種形成法で分析した。

【0023】表1および2は、対照培養に対するトリコスタチンAと酪酸ナトリウムのそれぞれの値を%で表した結果を示している。トリコスタチンAによるコラーゲンI型およびIII型の照射量依存阻害に注意する。星細胞の活性マーカーである、平滑筋 $\alpha$ -アクチンの強い阻害にも注意する。

【0024】

【表1】

表1: トリコスタチンAの結果

|                   | 100 nM         | 10 nM           | 1 nM            |
|-------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| コラーゲンI            | 37.9 $\pm$ 5.6 | 68.9 $\pm$ 4.7  | 91.7 $\pm$ 9.5  |
| コラーゲンIII          | 30.1 $\pm$ 9.6 | 73.2 $\pm$ 20.9 | 71.9 $\pm$ 21.0 |
| SM $\alpha$ -アクチン | 15.5 $\pm$ 7.4 | 54.4 $\pm$ 5.3  | 87.6 $\pm$ 0.3  |

【0025】酪酸ナトリウムは、1mmol/Lの濃度において平滑筋 $\alpha$ -アクチンを50%低下させただけで、あまり効果的には阻害しなかった。コラーゲンIII型および平滑筋 $\alpha$ -アクチン合成の阻害は、トリコスタチンAが酪酸塩よりも5桁分有効であることを示した。

【0026】

【表2】

表2: 酪酸ナトリウムの結果

|                   | 10 <sup>-3</sup> M | 10 <sup>-4</sup> M | 10 <sup>-5</sup> M |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| コラーゲンI            | 107.8 $\pm$ 9.8    | 127.9 $\pm$ 16.2   | 92.8 $\pm$ 11.7    |
| コラーゲンIII          | 67.9 $\pm$ 19.1    | 90.6 $\pm$ 42.2    | 109.4 $\pm$ 31.1   |
| SM $\alpha$ -アクチン | 50.0 $\pm$ 19.9    | 91.6 $\pm$ 23.4    | 97.9 $\pm$ 24.4    |

【0027】実施例2

肝臓星細胞によるコラーゲンI型およびIII型、並びに平滑筋 $\alpha$ -アクチンの遺伝子発現におけるトリコスタチンAの効果

肝臓星細胞を、実施例1の記載と同様にして採って培養した。細胞をトリコスタチンA 100nmol/Lに24時間曝露した。その後、RNAを抽出して、ノーザン雑種形成法で分析した。日中、3つの細胞をトリコスタチンA 10

0nmol/Lまたは酪酸ナトリウム1mmol/Lに24時間曝露した。合計RNAを、コムツィンスキー (Chomczynski) およびサッチ (Sacchi) の方法で抽出した。ラットのプロコラーゲン $\alpha_1$ (I) (1.6kb Pst I フラグメント)、ラットのプロコラーゲン $\alpha_1$ (III) (0.5kb HindIII/EcoRI フラグメント) およびグリセルアルデヒド-3-ホスフェート脱水素酵素 (GAPDH) (0.5kb XbaI/HindIII フラグメント) についてP-ラベルしたcDNAプローブを用いてノーザン雑種形成法を行った。平滑筋 $\alpha$ -アクチンmRNAの5'-未翻訳領域に対応するcRNAプローブを使用した。フォスフォーイメージング法で結果を定量してGAPDHと対応させた。

【0028】mRNAレベルでの結果を表3に示す。コラーゲンIII型および平滑筋 $\alpha$ -アクチンのmRNAレベルは、タンパク質レベルと同程度まで阻害された。他方、コラーゲンI型については、適度な阻害傾向しか観察されず、コラーゲンI型の阻害が主に翻訳後の (post translational) であることが示唆された。

【0029】

【表3】

表3

|                   | 100 nM          |
|-------------------|-----------------|
| コラーゲンI            | 79.3 $\pm$ 13.5 |
| コラーゲンIII          | 39.0 $\pm$ 13.5 |
| SM $\alpha$ -アクチン | 20.6 $\pm$ 15.4 |

【0030】実施例3

肝臓星細胞の細胞繁殖におけるトリコスタチンAおよび酪酸ナトリウムの効果

最後に、出願人は、高い繁殖活性が、筋繊維芽細胞分化の主な特徴の1つであることから、星細胞の繁殖におけるトリコスタチンAおよび酪酸ナトリウムの効果を評価した。細胞を、3つまたは4つの24ウェルプレート [コスター (Costar) 社製] で培養した。2つの細胞は、日中、4日間酪酸ナトリウム0.001~1mmol/LまたはトリコスタチンA 1~100nmol/Lに曝露した。培養培地と試験化合物は、毎日置き換えた。6つの細胞は、日中、トリプシン処理して血球計算板にてカウントした。トリコスタチンAは、100nmol/Lでは、増生に対する強い阻害効果を示した。表4に、上記細胞カウント結果をまとめる。

【0031】

【表4】

表4:細胞カウント結果

| 対照試料     | 10 <sup>-7</sup> M<br>トリコスタチンA | 10 <sup>-8</sup> M<br>トリコスタチンA | 10 <sup>-9</sup> M<br>トリコスタチンA |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 23.7±1.9 | 16.2±1.0                       | 22.0±3.0                       | 22.9±1.0                       |
| 対照試料     | 10 <sup>-7</sup> M<br>酪酸塩      | 10 <sup>-8</sup> M<br>酪酸塩      | 10 <sup>-9</sup> M<br>酪酸塩      |
| 23.9±2.0 | 20.4±0.2                       | 22.2±0.7                       | 21.1±2.0                       |

【0032】最後に、細胞を、3つまたは4つの24ウェルプレート（コスター社製）で培養した。日中、4つの細胞を、酪酸ナトリウム0.01~1mmol/LまたはトリコスタチンA1~100nmol/Lに24時間曝露した。その後、培地を変えて、細胞を、<sup>3</sup>H-チミジン10Ci/mL（比活性25Ci/mmol、10μCi/mL）の存在下、酪酸ナトリウムまたはトリコスタチンAと同じ濃度でさらに20時間インキュベートした。2%過塩素酸/95%エタノール/不溶分

測定した。ヒドロキシウレア10mmol/Lの存在下、<sup>3</sup>H-チミジンでインキュベートした平行培養が、ベースライン値を与え、それを、各測定から減じた。最終データは、平行ウェルのトリプシン処理によって決定した細胞数について統一した。表5に結果（cpm/細胞）を表す。

【0033】

【表5】

表5: [<sup>3</sup>H]-チミジン取り込み

| 対照試料     | 10 <sup>-7</sup> M<br>トリコスタチンA | 10 <sup>-8</sup> M<br>トリコスタチンA | 10 <sup>-9</sup> M<br>トリコスタチンA |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 10.0±0.8 | 1.3±0                          | 9.9±0.4                        | 9.6±0.4                        |
| 対照試料     | 10 <sup>-7</sup> M<br>酪酸塩      | 10 <sup>-8</sup> M<br>酪酸塩      | 10 <sup>-9</sup> M<br>酪酸塩      |
| 9.9±0.4  | 6.2±0.2                        | 9.5±0.3                        | 9.5±0.2                        |

#### 【0034】実施例4

##### 皮膚線維症の細胞繁殖についてのトリコスタチンAの効果

先の記載と同様の外植（explant）方法で、雄のウィスターラット（300~400g）から皮膚線維芽細胞を得た。ラットは全て、自由に摂食できるようにさせ、飼育のための施設の指導書および調査における研究動物の使用に従って人道的な保護を受けた。細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地で成長させて、5%CO<sub>2</sub>および95%空気を含む加湿した雰囲気において37℃で培養した。培養物がコンフルエント（confluent）になると、細胞をトリプシン処理して、分割比1:4で75cm<sup>2</sup>培養フラスコに再度プレATINGした。5~9回パスしたコンフルエント細胞を用いて評価を行った。予備試験は、上記条件下において、皮膚線維症が、評価時に、その大きな寸法によって示されるような表現型筋線維芽細胞、突起ストレス繊維、および平滑筋α-アクチンの発現を捕捉したことを示した。

#### 【0035】皮膚線維芽細胞のコンフルエント培養物

を、トリコスタチンA1、10および100nmol/Lに24時間曝露した。TGF-β<sub>1</sub>評価では、細胞を、組み換え型ヒトTGF-β<sub>1</sub>〔キャリバイオケム（Calbiochem）製〕5ng/mLおよび/またはトリコスタチンA100nmol/Lに24時間曝露した。上記化合物の初期の24時間の曝露の後、ビタミンC（50μg/mL）〔メルク（Merck）製〕およびβ-アミノプロピオニトリル（64μg/mL）〔シグマ製〕の存在下、トランス<sup>35</sup>S-ラベル〔<sup>35</sup>S-メチオニンの比活性>1,000Ci/mmol、ICNバイオメディカルズ（コスタ・メサ、カリフォルニア州）製〕50μCi/mLを用いて、細胞を24時間代謝的にラベルすると同時に、トリコスタチンAおよび/またはTGF-β<sub>1</sub>への曝露を継続した。ラベルした培地または細胞層を別個に採取して、-70℃で貯蔵した。タンパク質合成は、トリクロロ酢酸（TCA）沈殿により測定した。同じカウント数（10<sup>6</sup>cpm）のラベルした培地または細胞層を、免疫沈殿に付した。免疫沈殿は、コラーゲンI型〔サザン・バイオテクノロジー（Southern Biotechnology、バーミングハム、アラバマ州）製〕、同III型〔ディー・シュファン（D.Schuffan）教授（Fre

ie Univ., ベルリン、ドイツ) から譲渡されたもの]、または平滑筋 $\alpha$ -アクチン(クローン1A4、シグマ製)に対する抗体を用いて行った。免疫沈殿後、SDS-PAGEによってタンパク質を分離し、ゲルをアンブリファイ[Amplify、アマーシャム(Amersham)製、リトル・チャーフォート(Little Chalfort)、英国]中に浸漬して乾燥し、予めフラッシュ露光したオートラジオグラフィフィルム[ハイパーフィルム(Hyperfilm)-MP、アマーシャム製]に曝露するか、またはフォスファーイメージング[モレキュラー・イメージャー(Molecular Imager)、GS-525、バイオラッド(BioRad)、米国]で定量分析した。

【0036】繊維芽細胞のコンフルエント培養物を、トリコスタチンA 100nmol/Lおよび/またはTGF- $\beta_1$  5ng/mLに24時間曝露した。コムツィンスキーおよびサッチの方法によって合計RNAを抽出した。記載した如く、ラットのprocollagen  $\alpha_3$ (I) (1.6kb Pst I フラグメント)、ラットのprocollagen  $\alpha_1$ (III) (0.5kb Hind III/EcoRI フラグメント)、およびGAPDH(グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデハイドロゲナーゼ) (0.5kb Xba I/Hind III フラグメント)について、 $^{32}$ P-ラベルしたcDNAプローブを用いて、ノーザン雑種形成を行った。平滑筋 $\alpha$ -アクチンについては、前記と同様にmRNAを用いた。フォスファーイメージングで結果を定量してGAPDHと対応させた。

【0037】処理したタンパク質またはmRNAと対照物との比は、各評価条件について算出し、(平均 $\pm$ 標準偏差)として表した。タンパク質研究では、トリクロロ酢酸沈殿数に差があれば、補正をした。平均値を算出するのに使用した評価の数は、少なくとも3であった。効果は、1.0が処理したもの/対照物の比の95%確信のある範囲に属しないと、統計的に顕著であると考えられた。

【0038】その後、内因的に生成したタンパク質を $^{35}$ S-メチオニンで代謝的にラベルし、特定の抗体を用いてコラーゲンI型およびIII型を免疫沈殿させた。免疫沈殿したペプチドをSDS-PAGEで分離し、フォスファーイメージングで定量した。トリコスタチンA 100nmol/L、10nmol/Lおよび1nmol/Lが、コラーゲンI型の合成をそれぞれ、30%、44%および17%阻害することが分かった(表6、第2列)。同じ濃度のトリコスタチンAでは、コラーゲンIII型の合成を、41%、49%および10%阻害した(表6、第3列)。従って、コラーゲンI型およびIII型は、トリコスタチンAで阻害され(100nmol/Lでp

<0.05および10nmol/Lでp<0.01)、10nmol/Lで最大の効果が得られた。筋繊維芽細胞分化におけるマーカーである、平滑筋 $\alpha$ -アクチンの合成もそれぞれ、37 $\pm$ 18%、36 $\pm$ 8%阻害され、その後、トリコスタチンA 100nmol/Lおよび10nmol/Lに曝露した(表6、第4列)。TCA-沈殿カウントによって測定されるようなタンパク質合成のすべてには影響を及ぼさないため、これらのトリコスタチンAの阻害効果は選択的であった。

【0039】次に、トリコスタチンAが皮膚繊維芽細胞内のTGF- $\beta_1$ の線維症活性に影響を及ぼすか否かを調べた。この目的のために、細胞をTGF- $\beta_1$ 単独(5ng/mL)、トリコスタチンA(100ng/mL)単独、またはTGF- $\beta_1$ (5ng/mL)とトリコスタチンA(100ng/mL)の組み合わせに曝露した。コラーゲンI型およびIII型並びに平滑筋 $\alpha$ -アクチンを再度免疫沈殿させ、SDS-PAGEで分離し、ホスファーイメージングで定量した。表7に示すように、TGF- $\beta_1$ への曝露はそれぞれ、コラーゲンI型およびIII型の合成を3.4倍および4.7倍刺激した。刺激は、皮膚繊維芽細胞の各調製において生じたが、刺激の大きさは、コラーゲンI型では1.8~5.9倍の範囲、コラーゲンIII型では2.5~8.0倍の範囲で培養毎に異なった。TGF- $\beta_1$ は、平滑筋 $\alpha$ -アクチンの合成において、適度な刺激効果を与えた(1.8倍増)。顕著には、TGF- $\beta_1$ の抗原刺激効果は、TGF- $\beta_1$ およびトリコスタチン1を同時に加えると、ほとんどなくなった。

【0040】最後に、トリコスタチンAがその阻害効果を働かせるレベルで、皮膚繊維芽細胞によるコラーゲン合成において調査した。このために、皮膚繊維芽細胞を、再度、トリコスタチンAおよび/またはTGF- $\beta_1$ に曝露した。24時間曝露した後、合計RNAを抽出し、ノーザン雑種形成分析に付した。放射能を測定し、GAPDHと対応させて、対照培養物の値との比を表した。表8に示すように、TGF- $\beta_1$ (5ng/mL)は、コラーゲンI型およびIII型並びに平滑筋 $\alpha$ -アクチンの遺伝子発現をそれぞれ、2.3倍および2.5倍並びに1.7倍増加させた。トリコスタチンA単独(100nmol/L)は、コラーゲンI型およびIII型並びに平滑筋 $\alpha$ -アクチンのmRNAレベルに適度な阻害効果を与えた。これらのデータは、転写レベルと翻訳後レベルの両者において、トリコスタチンAの阻害効果が生じることを示唆している。上記実施例の結果を表6、7および8にまとめる。

【0041】

【表6】

表6：タンパク質レベルでのTSAの異なる濃度の効果

結果は、対照試料値の%として表す。

|                   | 100 nM   | 10 nM    | 1 nM     |
|-------------------|----------|----------|----------|
| コラーゲン I           | 70+/-13% | 56+/-11% | 83+/-11% |
| コラーゲン III         | 59+/-18% | 51+/-11% | 90+/-14% |
| SM $\alpha$ -アクチン | 63+/- 8% | 64+/- 8% | 86+/-23% |

【0042】

【表7】

表7：タンパク質レベルにおけるTGF- $\beta$ の誘導効果についてのTSAの効果

|                   | TGF- $\beta$   | TGF- $\beta$ +TSA | TSA          |
|-------------------|----------------|-------------------|--------------|
| コラーゲン I           | 347 $\pm$ 185% | 121 $\pm$ 39%     | 70 $\pm$ 13% |
| コラーゲン III         | 476 $\pm$ 273% | 86 $\pm$ 35%      | 59 $\pm$ 18% |
| SM $\alpha$ -アクチン | 175 $\pm$ 196% | 67 $\pm$ 6%       | 63 $\pm$ 8%  |

【0043】

【表8】

表8：mRNAレベルにおけるTGF- $\beta$ の誘導効果についてのTSAの効果

|                   | TGF- $\beta$  | TGF- $\beta$ +TSA | TSA          |
|-------------------|---------------|-------------------|--------------|
| コラーゲン I           | 231 $\pm$ 89% | 253 $\pm$ 49%     | 84 $\pm$ 14% |
| コラーゲン III         | 253 $\pm$ 94% | 180 $\pm$ 51%     | 74 $\pm$ 10% |
| SM $\alpha$ -アクチン | 171 $\pm$ 61% | 114 $\pm$ 24%     | 85 $\pm$ 16% |

【0044】本出願において、結果は、ヒストン・デアセチラーゼ阻害剤が、線維症繁殖疾患の処置において、新規治療の可能性を提供することを示している。

【0045】結論として、2つの無関係なヒストン・デアセチラーゼ阻害剤が、2つの周知の線維症経験的モデル（すなわち、肝臓線維症および皮膚線維症）として活性化抗線維症化合物であることを示した。

【0046】

【発明の効果】本発明は、有効量のヒストン・デアセチラーゼ阻害剤（特に、トリコスタチンAまたは製剤上容認できるその塩）および場合により適した付形剤を線維症で苦しむヒトまたは動物に投与することを含んで成る、前記被験体の処置方法に関する。

フロントページの続き

(72)発明者 トシロ・ニキ  
ベルギー、ペー-1780ウェメル、ステーン  
ウェッヒ・オブ・ブリュッセル43番